Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf

und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene
und Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

Autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik des intertubulären, fetalen Leydigzellsystems der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wilfried Nebel

1978

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544318_0025

Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf

und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene
und Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

Autoradiographische Untersuchungen zur Kinetik des intertubulären, fetalen Leydigzellsystems der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wilfried Nebel

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan	Referent
der Medizinischen Fakultät	gez.:
der Universität Düsseldorf	Prof. Dr. med. W. Hilscher
	Korreferent
gez.:	gez.:
Prof. Dr. med. H. Reinauer	Prof. Dr. med. H.G. Goslar

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 1

Material und Methodik 5

Ergebnisse 10

Diskussion 12

Zusammenfassung 21

Literatur 23

Anhang

a) Schema 1 - 3 29

b) Tabelle 1 31

c) Figur 1 33

Einleitung

Nach den Untersuchungen von van Straaten (1977) kann beim Schwein, das ein sehr ausgeprägtes Leydigzellsystem besitzt, zwischen einem intertubulären und einem peritubulären Leydigzellsystem unterschieden werden.

Detaillierte enzymhistochemische Untersuchungen des Leydigzellsystems der Ratte von Passia et al. (1977/78) haben ergeben, daß - in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von van Straaten am Schweinehoden - auch bei dieser Tierspezies zwischen einem intertubulären und einem peritubulären Leydigzellsystem differenziert werden kann.

Bei der Ratte entspricht das intertubuläre System weitgehend, wenn nicht ausschließlich dem fetalen Leydigzellsystem, das peritubuläre System weitgehend, wenn nicht ausschließlich dem Leydigzellsystem des adulten Tieres.

Daß zwischen beiden Systemen Unterschiede bestehen, haben unter anderem Roosen-Runge und Anderson (1959), Mancini et al. (1963), Niemi und Ikonen (1963), Steinberger und Ficher (1968) sowie Lording und de Kretser (1972) hervorgehoben.

Die enzymhistochemischen Untersuchungen von Passia et al. (1977/78) haben nun weiter ergeben, daß die Kinetik des intertubulären und des peritubulären Leydigzellsystems mit der Kinetik der Geschlechtszellen und der Stützzellen koordiniert ist.

Mit dem Auftreten der T_1-Prospermatogonien wird das vorher bereits angelegte intertubuläre Leydigzellsystem aktiv. Außerdem konnten Passia et al. (1977/78) zeigen, daß das peritubuläre System zu einem Zeitpunkt aktiv wird, zu dem die Majorität der Geschlechtszellen aus Spermatozyten besteht. Mit dem ersten Auftreten der Reifeteilungen und der Spermatiden nimmt die Aktivität des peritubulären Leydigzellsystems weiter zu.

Diese Ergebnisse wurden durch Quante et al. (1978) auf eine quantitative Basis gestellt: Es wurden nämlich die von Passia et al. (1977/78) in der obigen Arbeit benutzten Schnitte von männlichen Feten und postnatalen unreifen Gonaden mit dem Digiscan-Phasen-Integrator und dem MOB - Bildanalysator quantitativ ausgewertet. Mit dem Digiscan-Phasen-Integrator wurden diejenigen Areale bestimmt, in denen die Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase "aktiv" war, mit dem MOB-Bildanalysator wurden die Flächen der Testes ausgemessen. Es wurde dann eine relative Schwärzungskurve

aufgestellt, die den Prozentsatz der durch die Aktivität des Enzyms geschwärzten Areale an der Gesamtfläche der Testes pro Untersuchungstermin wiedergab. Diese Kurve zeigt einen ersten Anstieg zwischen dem 16. bis 18. Fetaltag; er weist auf eine Aktivitätszunahme des intertubulären Leydigzellsystems hin. Die Kurve sinkt dann vom 19. Fetaltag bis zum 7. Lebenstag auf Werte um 0,4 % ab und steigt zwischen dem 10. und dem 35. Lebenstag auf ungefähr das Dreifache des ersten Anstiegs an. Dieser zweite Anstieg ist auf eine Aktivitätszunahme des peritubulären adulten Leydigzellsystems zurückzuführen.

Daten über die Generationszeit und die einzelnen Zellzyklusphasen des intertubulären und peritubulären Leydigzellsystems liegen bisher noch nicht vor.

Solche Daten gewinnt man am einfachsten dadurch, daß die Zellen des zu untersuchenden Systems in der S-Phase radioaktiv markiert werden. Man kann dann die Kinetik der so markierten Zellen verfolgen.

Im Falle des intertubulären Leydigzellsystems wird die Markierung dadurch erschwert, daß die Plazentarschranke der Ratte ein Hindernis für die Passage des ^{3}H-Thymidins darstellt. Nach der i.p. Injektion des Muttertieres ist die im mütterlichen Blut vorhandene Konzentration des

applizierten radioaktiven Thymidins sieben Mal so hoch wie im fetalen Blut. Es muß daher den Muttertieren eine um sieben Mal höhere ^{3}H-Thymidin-Dosis angeboten werden als bei Jungtieren und adulten Tieren, um in S-Phase befindliche Zellen ausreichend zu markieren (Wegener et al. 1964, Hollweg 1966).

Von Hellmich et al., die zur Zeit den Zellzyklus und dessen Phasen bei Oogonien und M-Prospermatogonien untersuchen, stand eine Serie von Feten zur Verfügung, deren Muttertiere 34 Stunden bis zwei Stunden vor der Tötung ^{3}H-Thymidin erhalten hatten. Die Muttertiere waren am 17. Trächtigkeitstag getötet worden. Es konnte bisher je eine Kurve markierter Metaphasen von Oogonien und M-Prospermatogonien gewonnen werden, aus deren Verlauf die Dauer des Zellzyklus und seiner einzelnen Phasen zwischen dem 15. und 17. Fetaltag errechnet werden konnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, anhand der zur Verfügung stehenden Autoradiogramme der männlichen Feten analoge Daten über das intertubuläre Leydigzellsystem zu gewinnen.

Material und Methodik

Das Untersuchungsmaterial besteht aus den Gonaden männlicher Feten einer Versuchsserie, die zur Zeit von Hellmich et al. unter einer anderen Fragestellung ausgewertet wird.

Als Muttertiere dienten 15 Wistarratten (W.U.) der am Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung gezogenen Inzuchtlinie Müller/Haan. Die benötigten Rattenfeten wurden auf folgende Weise gewonnen:

Zwei Männchen wurden nachmittags um $15^{\underline{00}}$ h in einen Käfig zu zwei bis sechs gleich schweren Weibchen gesetzt. Am Morgen des folgenden Tages, des "ersten Trächtigkeitstages", wurden die Weibchen in der Zeit von $8^{\underline{00}}$ bis $9^{\underline{30}}$ h gewogen und in Einzelkäfigen untergebracht.

Den Graviditätsnachweis erbrachten Gewichtskurven, denen man die Meßdaten vom 5., 10. und 15. "Trächtigkeitstag" zugrundelegte. Gegenüber den nicht graviden Tieren sieht man bei den erfolgreich gedeckten, trächtigen Ratten eine signifikante Gewichtszunahme. Einen zusätzlichen Graviditätsbeweis erbrachte die am 12. Trächtigkeitstag durchgeführte Palpation der Feten durch die Bauchdecke des Muttertieres.

Vor der Tötung der trächtigen Weibchen am 17. Trächtigkeitstag um $12^{\underline{00}}$ h mittags hatten die Tiere eine einmalige i.p. Injektion mit ^{3}H-Thymidin erhalten (2 mCi ^{3}H-Thymidin/300 g Ratte, spez. Aktivität 5 Ci/mMol). Das ^{3}H-Thymidin war in einem Zeitabschnitt von 30 bis 2 Stunden vor der Tötung injiziert worden; die Injektionsintervalle betrugen zwei Stunden, so daß insgesamt an 15 Terminen vor der Tötung injiziert worden war.

Die dem Uterus entnommenen Feten wurden in Bouin'scher Lösung fixiert und in Kopf, Thorax- und Abdominalsegment geteilt. Von den in Paraplast eingebetteten Abdominalsegmenten stellte man 5 µ dicke Serienschnitte her, die mit Hämalaun gefärbt wurden.

Darauf erfolgte die Herstellung der Autoradiogramme, bei denen Ilford K2-Emulsion - 1:2 mit Aqua dest. verdünnt - verwandt wurde.

Anhand dieser Autoradiogramme kamen die rechte und die linke Gonade (jeweils gesondert) von je zwei männlichen Feten pro Injektionstermin zur Auswertung.

Es wurde der Prozentsatz markierter Leydigzellmetaphasen pro Injektionstermin bestimmt. Zahlenmäßig umfaßte die Untersuchung 30 Feten bzw. 60 Gonaden; es wurden insge-

samt 5.767 Mitosen ausgewertet.

Eine positive Markierung der Leydigzellmetaphase wurde dann angenommen, wenn über der ausgewerteten Metaphase fünf und mehr "Silberkörner" lagen.

Diese relativ hohe Silberkornzahl pro Zelle als Markierungskriterium wurde gewählt, um mit Sicherheit eine "Pseudomarkierung" auszuschließen. Eine solche "Pseudomarkierung" kann einmal bedingt sein durch die Qualität der verwendeten Emulsion, die Handhabungen bei der Herstellung der Autoradiogramme und durch Höhenstrahlung - man spricht von "Background" oder "Nulleffekt" des Autoradiogramms - zum anderen durch "Impurities". Unter "Impurities" versteht man die durch Selbstradiolyse entstandenen Metabolite des ^{3}H-Thymidins, die im Zytoplasma der Zelle eingelagert werden; diese können sich unter Umständen in Kernnähe lokalisieren und eine positive Markierung vortäuschen.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme wurde nach der Methode der markierten Mitosen (genauer: der markierten Meta- und Anaphasen) verfahren (Quastler und Sherman 1959).

Wie in Schema 1 zu ersehen, durchläuft eine proliferierende Zelle während ihrer Lebensdauer (Generationszeit)

verschiedene Phasen des Zellzyklus. Durch die Mitose ihrer Mutterzelle aus dieser hervorgegangen, macht sie zunächst die 1. Ruhepause oder G1-Phase (postmitotic gap) durch, dann durchläuft sie die DNS-Synthesephase oder S-Phase und darauf die 2. Ruhephase oder G2-Phase (premitotic gap), sie tritt dann ihrerseits in die Mitose M; aus ihr gehen wieder zwei neue Tochterzellen hervor.

Die Markierung mit ^{3}H-Thymidin erfolgt nur in der S-Phase. Anhand von Schema 2 soll nun die Methode der markierten Mitosen näher erläutert werden:

Als Beispiel sollen die in der S-Phase markierten A_1-Spermatogonien dienen (Hilscher, W. 1966). Zunächst injizierte man einer Gruppe von Ratten eine einmalige Dosis 500 µCi ^{3}H-Thymidin/Tier. Die Versuchstiere wurden in verschiedenen Abständen bis zu 80 Stunden getötet; von den Testes wurden Autoradiogramme hergestellt. Die Auswertung der Autoradiogramme ergab eine Kurve, die den zeitlichen Verlauf der Prozentsätze markierter Mitosen wiedergibt. Der Kurvenverlauf spiegelt die Wanderung der in S-Phase markierten A_1-Spermatogonien und deren Descendenten wieder: 10 Stunden nach Injektion von ^{3}H-Thymidin traten die ersten markierten Mitosen der A_1-Spermatogonien auf. Das bedeutete, daß die ersten in S-Phase markierten A_1-Spermatogonien die G2-Phase durchlaufen und ihre Teilung begonnen hatten. 12 Stunden nach der Injektion waren schon 100 % der A_1-Mitosen markiert. Die Kurve fiel dann wieder auf 0 % markierte Mitosen ab. Zu diesem Zeitpunkt hatten alle markierten A_1-Spermatogonien die Mitose durchlaufen. Die aus ihnen entstandenen A_2-Spermatogonien durchliefen ihrerseits nach

einer gewissen Zeit die Mitose und wurden zu A_3-Spermatogonien. Anhand der Kurve ließ sich nun die Lebensdauer oder Generationszeit der A_2-Spermatogonien bestimmen: Sie ist nämlich gleich dem Intervall zwischen A_1- und A_2-Mitosemaximum. Sie belief sich in diesem Fall auf 39 Stunden. Außerdem ließ sich aus der ersten Maximumkurve der Wert für die S-Phasendauer der A_1-Spermatogonien ermitteln (siehe Schema 2). Sie ist gleich dem Intervall zwischen den auf halber Höhe der Kurve liegenden Punkten des ansteigenden und des absteigenden Schenkels. Bei den A_1-Spermatogonien entsprach dieses Intervall der 50 % Breite der ersten Kurve. Ihre S-Phasendauer zeigte einen Wert von 19,5 Stunden.

Bei Anwendung der Methode der "markierten Mitosen" von Quastler und Sherman (1959) wird der Injektionstermin konstant gehalten und die Tötungstermine variieren.

Dieses Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit modifiziert: Man hielt den Tötungstermin konstant und variierte die Injektionstermine. Das Verfahren der "markierten Mitosen" wurde also umgekehrt.

Ergebnisse

Die Resultate der vorliegenden Auswertung sind aus Tabelle 1 und aus Fig. 1 zu ersehen.

Tabelle 1:

Spalte 1 gibt die Injektionsintervalle an, d.h. den Zeitabschnitt zwischen der Injektion mit ^{3}H-Thymidin und der Tötung - angefangen von 2 Stunden bis 30 Stunden vor der Tötung. In Spalte 2 und 3 sind die Prozentsätze markierter Leydigzellmetaphasen der rechten bzw. der linken Gonaden aufgeführt. Spalte 4 und 5 enthalten die Mittelwerte und deren Vertrauensbereiche für die markierten Leydigzellmetaphasen.

Fig. 1:

Die Kurve in Fig. 1 gibt den zeitlichen Verlauf der Prozentsätze markierter Metaphasen der in S-Phase ^{3}H-markierten Leydigzellen wieder. Bereits zwei Stunden nach radioaktiver Thymidingabe sind 42 % der Leydigzellmetaphasen markiert. Die Kurve steigt anfangs mehr, später weniger steil zu einem Plateau bzw. Maximum an, das etwa beim "8 Stundenwert" beginnt. Zu diesem Zeitpunkt sind mehr als 90 % der Leydigzellmetaphasen markiert. Dieses Plateau bzw. Maximum fällt nach dem "14 Stundenwert" wieder ab. 16 Stunden nach der ^{3}H-Thymidin-Injektion sind nur noch

83 % der Leydigzellmetaphasen radioaktiv markiert. Die Kurve sinkt dann weiter ab, um dann mit dem "20 Stunden-wert" ihren tiefsten Punkt zu erreichen. Danach nimmt die Kurve wieder einen ansteigenden Verlauf, um dann 26 Stunden nach ^{3}H-Thymidin-Gabe wieder ein Plateau zu erreichen.

Aus dem Verlauf der Kurve im Bereich des 1. Maximums kann nun die Dauer der S-Phase der Leydigzellen ermittelt werden. Sie ist gleich dem Abstand zwischen den auf halber Höhe liegenden Punkten des ansteigenden und abfallenden Kurvenanteils. Die S-Phasendauer der fetalen Leydigzellen beträgt demnach 16,9 Stunden.

Aus der vorliegenden Kurve kann weiterhin die minimale Generationszeit (T_{min}) der Leydigzellen bestimmt werden. T_{min} ist gleich dem Intervall zwischen korrespondierenden Punkten der ascendierenden Schenkel des 1. und 2. Maximums (Hempel 1968). Die minimale Generationszeit der Leydigzellen beträgt in diesem Fall 19,6 Stunden.

D i s k u s s i o n

Nach den Angaben der Düsseldorfer Arbeitsgruppe Biologie und Klinik der Reproduktion läßt sich der Testis des Erwachsenen in folgende Compartments gliedern:

1. in das Geschlechtszellcompartment,
   bestehend aus
   a) dem basalen Compartment (Dym und Fawcett 1970), das der Basalmembran anliegt bzw. an diese reicht und sich zusammensetzt aus den verschiedenen Spermatogonientypen in der Interphase und in Mitose sowie den praemeiotischen I-Spermatozyten,
   b) dem adluminalen Compartment (Dym und Fawcett 1970), das im Sertolizellcompartment verankert ist und sich zusammensetzt aus den leptotänen, zygotänen, pachytänen, diplotänen und diakinetischen I-Spermatozyten, den Mitosefiguren der 1. Reifeteilung, den II-Spermatozyten, den Mitosefiguren der 2. Reifeteilung sowie den runden und elongierten Spermatiden.

2. in das Compartment der Sertolizellen,
   das durch FSH stimuliert wird und das Androgen-bindende-Protein bildet und das sich - entsprechend dem Geschlechtszellcompartment - aus einem basalen und

einem adluminalen Teil zusammensetzt, deren Grenze durch einen schmalen Bereich aus "tight junctions" markiert wird (Dym und Fawcett 1970).

3. in das Compartment des sogenannten Grenzgewebes oder "boundary tissue",
   das die Samenkanälchen vom Interstitium abgrenzt, neben Fibrozyten myoide Zellen mit der Fähigkeit zur Kontraktion enthält und eine bei den einzelnen Säugerspezies unterschiedlich stark ausgeprägte Diffusionsschranke darstellt (Bustos-Obregon 1976).

4. in das Compartment der Leydigzellen,
   das durch LH bzw. ICSH und durch HCG stimuliert wird und sich nach neueren Untersuchungen aus zwei verschiedenen Systemen zusammensetzt, einem intertubulären und einem peritubulären (van Straaten 1977, Passia et al. 1978).

5. in das interstitiell-extravasale Compartment,
   das aus dem Interstitium minus Leydigzellen und Gefäßen besteht und vor allem fibrozytäre Elemente, Nervenfasern und Lymphspalten enthält.

6. in das vasale Compartment,
   das sich aus Kapillaren sowie den vor- und nachgeschalteten Gefäßabschnitten zusammensetzt.

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit dem unter Punkt 4 aufgeführten Leydigzellcompartment, und zwar mit dessen "fetaler" bzw. "intertubulärer" Komponente, von der zum heutigen Zeitpunkt noch nicht bekannt ist, ob und in welcher Weise sie im adulten Testis und Individuum wirkt.

Die bisherigen morphologischen Untersuchungen über das fetale bzw. intertubuläre Leydigzellcompartment haben ergeben, daß die Zellen dieses Systems bereits eine hochgradige Differenzierung zeigen, wenn der größte Teil der übrigen somatischen Zellen - ihrem embryonalen bzw. fetalen Charakter entsprechend - noch weitgehend undifferenziert ist.

Denn wie Holstein, Wartenberg und Vossmeyer (1971) aufgrund von Untersuchungen an menschlichen Embryonen und Feten der 7.-22. Schwangerschaftswoche zeigen konnten, weisen die fetalen Leydigzellen im Laufe ihrer Entwicklung - also zwischen der 7.-12. Schwangerschaftswoche - eine elektronenmikroskopisch auffällige Differenzierung ihres endoplasmatischen Retikulums (ER) auf. Dieses erfährt in der 12. Schwangerschaftswoche eine starke Entfaltung und verdrängt alle Zellorganellen weitgehend. Ein derart "hochentwickeltes" ER konnte weder in den Leydigzellen Erwachsener, noch in den Leydigzellen adulter Individuen anderer Säugerspezies nachgewiesen werden.

Ein "hochentwickeltes" ER, wie es in den fetalen bzw. intertubulären Leydigzellen der Mammalia vorkommt, ist für steroidbildende Zellen charakteristisch (Brenner 1966, Christensen und Fawcett 1966).

Aufgrund der bisher bekannten bio- und histochemischen Untersuchungen scheint es wohl gesichert zu sein, daß ein fetales Androgen von Leydigzellen produziert wird (Acevedo et al. 1963, Niemi und Ikonen 1962, Jost 1967).

Daß die fetalen Leydigzellen als Androgenproduzenten entscheidenden Anteil an der Sexualentwicklung und -differenzierung haben, geht aus dem sehr übersichtlichen Artikel von Neumann (1977) über die "Hormonale Regulation der Sexualdifferenzierung bei Säugetieren" hervor (Schema 3). In diesem Artikel wird die geschlechtliche Differenzierung in vier Schritten beschrieben, die von Hilscher, W. (1978) zusammengefaßt wiedergegeben wurde.

Im ersten Schritt erfolgt mit der Vereinigung der beiden Gameten und der Bildung der Zygote die Festlegung des genetischen oder chromosomalen Geschlechts. Entsprechend dem genetischen Geschlecht entstehen aus den zunächst noch undifferenzierten Gonadenanlagen Ovarien und Testes. Das gonadale Geschlecht ist damit im zweiten Schritt fest-

gelegt. Es scheint, daß keinerlei hormonale Impulse oder Induktoren für die Differenzierung der Gonadenanlagen in Ovarien erforderlich sind. Ob die genetische Information für die Differenzierung der Gonadenanlagen in Testes im Y-Chromosom lokalisiert ist oder in einem Autosom, ist noch nicht geklärt (Wolf 1978). Nach Wachtel et al. (1975) wäre für die Ausbildung eines Testis nur ein einziger Genlocus notwendig. Dieses Gen könnte die Synthese eines Regulatorproteins induzieren, das dann seinerseits die Differenzierung der somatischen Zellen zu Testiszellen hervorruft: Es entstehen die Keimstränge, die Vorläufer der Tubuli seminiferi, die neben den Geschlechtszellen die Stützzellen als Vorläufer der Sertolizellen enthalten. Weiterhin bilden sich die um die Keimstränge gelegenen Wandzellen, welche die Matrix für das spätere Grenzgewebe ("boundary tissue") und möglicherweise auch für das später entstehende präpuberale oder peritubuläre Leydigzellsystem darstellen, sowie die "fetalen" intertubulären Leydigzellkomplexe. Nach der Festlegung des gonadalen Geschlechts erfolgt nun im dritten Schritt die somatische Geschlechtsdifferenzierung. Für die Entwicklung in ein typisch weibliches Genitale ist keine hormonale Stimulation erforderlich, für die Differenzierung in ein typisch männliches Genitale sind wenigstens zwei Faktoren notwendig:

1. Androgene, die für die Ausbildung der männlichen Strukturen des inneren und äußeren Genitale verantwortlich

sind: Aus den Wolffschen Gängen bilden sich die Ductus epididymides, deferentes et ejaculatores sowie die Vesiculae seminales; die Pars pelvina des Sinus urogenitalis entwickelt sich zum unteren Abschnitt der Pars prostatica und der Pars membranacea der Harnröhre, zur Prostata und den Glandulae bulbourethrales; aus der Pars phallica des Sinus urogenitalis entsteht die Pars spongiosa der Harnröhre. Der Phallus bildet sich zum Corpus cavernosum penis um, die Geschlechtsfalten entwickeln sich zum Corpus spongiosum penis mit der Glans penis, die Geschlechtswülste zum Skrotum.

2. Das sog. "Anti-Müllerian Hormone", bei dem es sich wahrscheinlich um ein Peptidhormon mit einem Molekulargewicht von etwa 100.000 handelt und das die Rückbildung der Müllerschen Gänge bewirkt.

Nach der Festlegung des somatischen Geschlechts erfolgt nun im vierten Schritt die psychische Geschlechtsdifferenzierung bzw. die Ausbildung des psychischen Geschlechts. Auch die Differenzierung des psychischen Geschlechts hängt davon ab, ob Androgene einwirken oder nicht. Im ersteren Fall wird das psychische Geschlecht männlich, im letzteren weiblich.

Aus dem Dargelegten wird die bedeutende Rolle der "fetalen" bzw. "intertubulären" Leydigzellen als Androgenproduzenten

und damit als Induktoren der männlichen Geschlechtsdifferenzierung deutlich.

Die Tatsache, daß nach Roosen-Runge (1959) die fetale Leydigzellentwicklung bei Ratten am 19. Fetaltag einen Höhepunkt erreicht und nach Wells (1956) gerade zu diesem Zeitpunkt bei dieser Säugerspezies die Degeneration der Müllerschen Gänge beginnt, führt zu der Frage, ob auch die Bildung des "Anti-Müllerian Hormone" durch die fetalen Leydigzellen erfolgt. Dies erscheint deshalb möglich, da die fetalen bzw. intertubulären Leydigzellen höher differenziert sein sollen als die "präpuberal-adulten" bzw. "peritubulären" Leydigzellen (Holstein 1978).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie über die Bestimmung der Generationszeit T und der S-Phasendauer der "fetalen" bzw. "intertubulären" Leydigzellen stehen in voller Übereinstimmung mit den Ergebnissen der oben genannten morphologischen Untersuchungen an menschlichen "fetalen" Leydigzellen, wonach das "fetale" bzw. "intertubuläre" Leydigzellcompartment ein hochdifferenziertes "adultes" Zellsystem darstellt. Besonders die gegenüber anderen somatischen Zellen sehr lange S-Phasendauer von etwa 17 Stunden ist ein sehr deutliches Indiz für den hohen Spezialisierungsgrad der fetalen bzw. intertubulären Leydigzellen.

Denn die zunehmende S-Phasendauer einer Zellart soll mit einer zunehmenden Heterochromatisierung dieser Zellart einhergehen (Monesi 1967).

In diesem Zusammenhang sei auf die Untersuchungsergebnisse von Monesi (1962), Hilscher, B. et al. (1969) und Hochereau de Riviers (1967) hingewiesen, die bei der Maus, der Ratte und dem Stier zeigen konnten, daß die differenzierenden Spermatogonien bei gleichbleibender Generationszeit T und gleichbleibender Dauer der G_1-Phase eine von Teilung zu Teilung abnehmende Dauer der G_2-Phase und zunehmende S-Phasendauer aufweisen. So beträgt zum Beispiel bei der Ratte die S-Phasendauer der am Anfang des Differenzierungsprozesses stehenden A_1-Spermatogonien 19,5 Stunden (s. Schema 2), die der letzten differenzierenden Spermatogoniengeneration, der B-Spermatogonie, 25,5 Stunden.

Da die Aussage, wonach eine Zelle um so differenzierter ist, je stärker ihre Heterochromatisierung ist, generelle Gültigkeit besitzt (Schwarzacher 1976), liegt der Gedanke nahe, daß die lange S-Phasendauer der fetalen bzw. intertubulären Leydigzellen eine ausgeprägte Heterochromatisierung und damit einen hohen Differenzierungsgrad anzeigt.

Daß dies in der Tat der Fall ist, zeigen jüngste elektronen-mikroskopische Untersuchungen von Schulze und Hilscher

(in Vorbereitung) sowie enzymhistochemische Untersuchungen von Passia et al. (1977/78), die nachweisen konnten, daß die Leydigzellen der Ratte um den 17. Fetaltag hochspezialisiert sind und eine starke Aktivität der Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase aufweisen. Dieses Enzym ist nach Angaben in der Literatur die Voraussetzung für die Steroidsynthese (Samuels und Helmreich 1956, Niemi und Ikonen 1961).

Zusammenfassung

Nach den Untersuchungen von van Straaten (1977) am Schweinehoden und von Passia et al (1977/78) bei der Ratte kann zwischen einem fetalen bzw. intertubulären und einem präpuberal-adulten bzw. peritubulären Leydigzellsystem unterschieden werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Methode der markierten Mitosen quantitative Aussagen über die Generationszeit und die S-Phasendauer der fetalen, intertubulären Leydigzellen zu machen.

Das Untersuchungsmaterial bestand aus den Gonaden männlicher Feten, deren Muttertiere 30 Stunden bis 2 Stunden vor der Tötung - in zweistündlichen Abständen - eine einmalige i.p. Injektion ^{3}H-Thymidin (2 mCi/300 g Ratte) erhalten hatten. Die Muttertiere waren dann am 17. Trächtigkeitstag getötet worden. Von den dem Uterus entnommenen Feten wurden zunächst mit Hämalaun gefärbte Serienschnitte und anschließend von den Testes Autoradiogramme hergestellt. Anhand dieser Autoradiogramme kamen die rechte und die linke Gonade von je zwei männlichen Feten pro Injektionstermin zur Auswertung. Es wurde der Prozentsatz markierter Leydigzellmetaphasen pro Injektionstermin bestimmt.

Die Ergebnisse der Auswertung sind aus Tabelle 1 bzw. aus Figur 1 ersichtlich. Die Kurve in Figur 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Prozentsätze markierter Metaphasen der in S-Phase ^{3}H-markierten Leydigzellen. Aus dem Verlauf dieser Kurve kann die Dauer der S-Phase und die minimale Generationszeit der fetalen Leydigzellen bestimmt werden. Die S-Phasendauer der fetalen Leydigzellen beträgt 16,9 Stunden, ihre minimale Generationszeit beläuft sich auf 19,6 Stunden.

Dieses Ergebnis einer gegenüber anderen embryonalen somatischen Zellen sehr langen S-Phasendauer ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß in Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Holstein, Wartenberg und Vossmeyer 1971 das fetale, intertubuläre Leydigzellcompartment als ein hochdifferenziertes, "adultes" Zellsystem aufzufassen ist.

Ein Indiz für die hohe Spezialisierung dieser Zellart ist die - von Neumann 1977 dargelegte - bedeutende Rolle der fetalen bzw. intertubulären Leydigzellen als Androgenproduzenten und damit als Induktoren der männlichen Sexualdifferenzierung.

Auch die enzymhistochemischen Untersuchungen von Passia et al. 1977/78 zeigen den hohen Differenzierungsgrad der fetalen Leydigzellen an.

L i t e r a t u r

ACEVEDO, H.F., L.R. AXELROD, E. ISCHIKAWA, F. TAKAKI: Studies in fetal metabolism. II. Metabolism of progesterone-4-C^{14} and pregnenolone-7-H^{3} in human fetal testes. J. clin. Endocrinology 23, 885-890 (1963)

BRENNER, R.M.: Fine structure of adrenocortical cells in adult male rhesus monkeys. Amer. J. Anat. 119, 429-453 (1966)

BUSTOS-OBREGON, E.: Ultrastructure and function of the lamina propria of mammalian seminiferous tubules. andrologia 8, 179-185 (1976)

CHRISTENSEN, A.K., D.W. FAWCETT: The fine structure of testicular cells in mice. Amer. J. Anat. 118, 551-571 (1966)

DYM, M., D.W. FAWCETT: The blood-testis barrier in the Rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biol. of Repr. 3, 308-326 (1970)

HELLMICH, I., B. HILSCHER, W. HILSCHER: Kinetics of Gametogenesis III. Further comparative studies of Oogonia and Multiplying Prospermatogonia of the Wistar Rat (im Druck)

HEMPEL, K.: Analyse des Zellzyklus der Melanocyten des Harding-Passey-Melanoms der Maus unter besonderer Berücksichtigung der "Growth-Fraction". Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 1, 15-30 (1968)

HILSCHER, B., W. HILSCHER, W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen über den Modus der Proliferation und Regeneration des Samenepithels der Wistarratte. Zschr. Zellforsch. 94, 593-604 (1969)

HILSCHER, W.: Der Proliferationsmodus des Samenepithels. Verhandlungen der Dtsch. Gesellsch. f. Path. 50, 149-155 (1966)

HILSCHER, W.: Beiträge zur Spermatogenese des Menschen (im Druck)

HOCHEREAU, M.T.: Synthèse de l'ADN au cours des multiplications et du renouvellement des spermatogonies chez le taureau. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl. 56, 85-96 (1967)

HOLLWEG, S.: Autoratiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und des Generationszyklus, sowie der anderen Teil-Phasen des Zyklus bei fetalen Zellarten der Ratte. Diss. Med. Fak. Univ. Köln 1966

HOLSTEIN, A.F., H. WARTENBERG, J. VOSSMEYER: Zur Cytologie der pränatalen Gonadenentwicklung beim Menschen. III. Die Entwicklung der Leydigzellen im Hoden von Embryonen und Feten. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 135, 43-66 (1971)

HOLSTEIN, A.F.: Persönliche Mitteilung (1978)

JOST, A.: Steroids and sex differentiation of the mammalian foetus. Excerpta Med. Int. Congr. Series 132, Proc. of the 2nd Int. Congr. on Hormonal Steroids, 74-81 (1967)

LORDING, D.W., D.M. DE KRETSER: Comparative ultrastructural and biochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. J. Reprod. Fert. 29, 261-269 (1972)

MANCINI, R.E.,O. VILAR, J.C. LAVIERI, J.A. ANDRADA, J.J. HEINRICH: Development of Leydig cells in the normal human testis: A cytological, cytochemical and quantitative study. Amer. J. Anat. 112, 203-214 (1963)

MONESI, V.: Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. J. Cell Biol. 14, 1-18 (1962)

MONESI, V.: Diskussionsbemerkung zu dem Beitrag von W. Hilscher: DNA - synthesis, proliferation and regeneration of the spermatogonia in the rat. Colloque Internat. sur la Physiologie de la Reproduction chez les Mammifères.Paris 1966 in: Arch. Anat. Micr. Morph. exp. 56, 75-84 (1967)

NEUMANN, F.: Hormonale Regulation der Sexualdifferenzierung bei Säugetieren. Vorlesungsreihe Schering Heft 3. (1977)

NIEMI, M., M. IKONEN: Steroid-3-ol-dehydrogenase activity in foetal Leydig's cells. Nature 189, 592-593 (1961)

NIEMI, M., M. IKONEN: Cytochemistry of Oxidative Enzyme Systems in the Leydig Cells of the Rat Testis and Their Functional Significance. Endocrionology 70, 167-174 (1962)

NIEMI, M., M. IKONEN: Histochemistry of the Leydig Cells in the Postnatal Prepubertal Testis of the Rat. Endocrinology 72, 443-448 (1963)

PASSIA, D., H.G. GOSLAR, J. HAHNER, W. HILSCHER, B. HILSCHER: Histochemische Untersuchungen zur Kinetik des fetalen und präpuberalen Leydigzell-Systems der Ratte. Veterinär-Humanmedizinische Tagung Gießen 1978

QUANTE, W., D. PASSIA, W. HILSCHER: Die Bestimmung der Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase im Leydigzellsystem der Ratte durch den Digiscan-Phasen-Integrator. Veterinär-Humanmedizinische Tagung Gießen 1978

QUASTLER, H., F.G. SHERMAN: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell. Res. 17, 420-438 (1959)

ROOSEN-RUNGE, E.C., D. ANDERSON: The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. Acta anat. 37, 125-137 (1959)

SAMUELS, L.T., M.L. HELMREICH: The influence of chorionic gonadotropin on the 3ß-ol-dehydrogenase activity of testes et adrenals. Endocrinology 58, 435-442 (1956)

SCHWARZACHER, H.G.: Chromosomes in mitosis and interphase. Hdb. mikroskop. Anat. Mensch (ed. W. Bargmann), Bd. I/3 Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1976

STEINBERGER, E., M. FICHER: Conversion of progesterone to testosterone by testicular tissue at different stages of maturation. Steroids 11, 351-368 (1968)

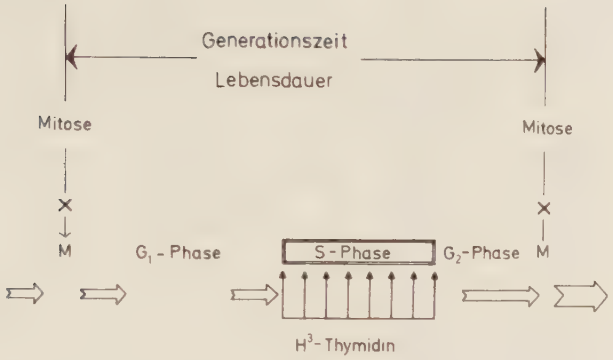
VAN STRAATEN, H.W.M.: Two types of Leydig cells in the testis of the pig. Acta Anat. 99, 345 (1977)

WACHTEL, S.S., G.C. KOO, E.A. BOYSE: Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. Nature (Lond.), 257, 235-236 (1975)

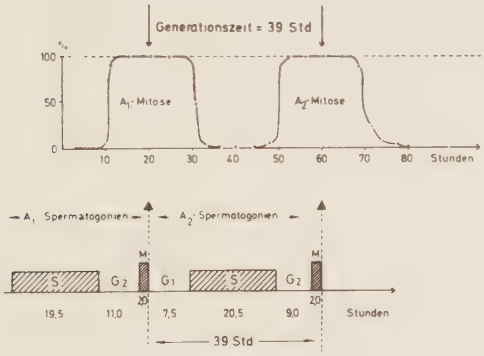
WEGENER, K., S. HOLLWEG: Autoradiographische Bestimmung der Generationszeit und der Dauer von Teilphasen bei fetalen Zellen der Ratte. Anat. Anz. 115, 134-140 (1964)

WELLS, L.J.: Effect of fetal endocrines on fetal growth. Trans. Macy Foundation 3, 187-227 (1956)

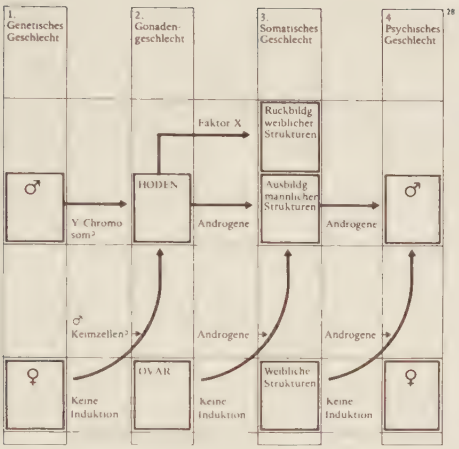
WOLF, U.: Gonadendifferenzierung und H-Y Antigen. 73. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Innsbruck, 12.-15.9.78. Vortrag. Verh. Anat. Ges. 73 (im Druck)



Schema 1: Teilphasen G-1, S, G-2 und M, die eine proliferierende Zelle während ihrer Generationszeit durchläuft (nach Hilscher, W. 1966).



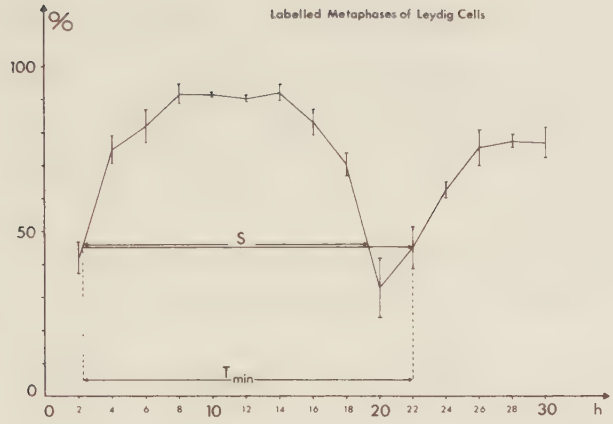
Schema 2: Methode der markierten Mitosen, gezeigt am Beispiel der in der S-Phase markierten A_1-Spermatogonien (nach Hilscher, W. 1966).



Schema 3: Zeitlich aufeinanderfolgende Schritte der Sexualdifferenzierung mit den daran beteiligten Steuerungsfaktoren sowie Möglichkeiten der Störung (nach Neumann 1977)

Tabelle 1: Spalte 1 gibt die Injektionsintervalle mit ^{3}H-Thymidin an. Spalte 2 und 3 zeigen die Prozentsätze markierter Leydigzellmetaphasen der rechten bzw. linken Gonaden. Spalte 4 und 5 enthalten die Mittelwerte und deren Vertrauensbereiche für die markierten Leydigzellmetaphasen.

^{3}H-Thy. Interv.	Prozent mark.Meta. re. Gon.	Prozent mark.Meta. li. Gon.	Mittelwert	Vertrauensbereich des Mittelwertes
2 2	41,7 44,6	38,1 44,1	42,1	37,4 - 46,8
4 4	73,3 74,7	73,1 78,9	75,0	70,7 - 79,3
6 6	82,9 84,8	77,6 83,3	82,2	77,2 - 87,1
8 8	90,1 91,7	94,3 90,5	91,7	88,7 - 94,7
10 10	91,6 91,2	91,5 92,0	91,6	91,1 - 92,1
12 12	90,7 91,2	89,7 90,2	90,5	89,4 - 91,5
14 14	91,9 93,4	93,5 90,3	92,3	89,9 - 94,7
16 16	80,0 83,0	85,4 84,8	83,3	79,5 - 87,1
18 18	72,0 72,7	69,9 67,8	70,6	67,1 - 74,1
20 20	27,7 38,5	28,6 37,4	33,1	24,0 - 42,1
22 22	42,4 49,5	41,1 47,8	45,2	38,7 - 51,7
24 24	62,5 64,7	61,1 63,8	63,0	60,5 - 65,5
26 26	78,0 78,9	74,7 71,4	75,8	70,3 - 81,2
28 28	78,0 77,8	76,1 79,3	77,8	75,7 - 79,9
30 30	78,5 78,9	73,1 79,1	77,4	72,8 - 82,0



Figur 1: Die Kurve gibt den zeitlichen Verlauf der Prozentsätze markierter Metaphasen der in S-Phase ^{3}H-markierten Leydigzellen wieder.

Für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Auswertung und der Zusammenstellung der Ergebnisse gebührt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. med. Werner Hilscher.

Herrn Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Für wichtige Hinweise bei der morphologischen Auswertung danke ich besonders auch Frau Barbara Hilscher.

Ich danke auch Herrn cand.med. B. Dulisch und Frau Dipl.-Math. U. Krämer für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 1. November 1951 als Sohn des Postamtmanns Karl Nebel und seiner Ehefrau Margret, geb. Pickhardt, in Bochum geboren.

Von Ostern 1958 bis Ostern 1962 besuchte ich die Kath. Volksschule an der Wiemelhauserstr. 84 in Bochum. Dann wechselte ich an das Humanistische Staatliche Gymnasium am Ostring 23, Bochum, an dem ich am 18. Juni 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Wintersemester 1970/71 immatrikulierte ich mich an der Ruhr-Universität Bochum in den Fächern Chemie und Biologie. Zum Sommersemester 1971 wechselte ich dann das Studienfach und den Studienort und begann im April 1971 das Medizinstudium an der Universität Düsseldorf. Dort legte ich am 30. März 1972 das Vorphysikum und am 8. Oktober 1973 die Ärztliche Vorprüfung ab. Vom Wintersemester 1973/74 an setzte ich das Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn fort und bestand dort nach 6 Klinischen Semestern und insgesamt 11 Semestern Medizinstudium am 31. Januar 1977 das Medizinische Staatsexamen.

Vom 1. September 1977 bis zum 31. Dezember 1977 arbeitete ich als Medizinalassistent auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Goslar. Danach verbrachte ich - ebenfalls als Medizinalassistent - vier Monate auf der Geburtshilflich-Gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Bad Harzburg, und zwar in der Zeit vom 1. Januar 1978 bis 30. April 1978.

Danach unterbrach ich meine Medizinalassistentenzeit und ging aus persönlich-privaten Gründen an die Universität Düsseldorf zurück, um dort zu promovieren.

Seit dem 15. September 1978 bin ich Medizinalassistent an der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Düsseldorf-Gerresheim.

Düsseldorf, den 23. Oktober 1978